

**Nachweis verschiedener Aminoacyl-Verbindungen
als Zwischen- oder Nebenprodukte der
Aminoacylierung von Transfer-Ribonucleinsäuren**

Christoph Niebler

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0020

Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Physikalische
Biochemie und Zellbiologie der Universität München

Vorstand: Professor Dr. H.G. Zachau

Nachweis verschiedener Aminoacyl-Verbindungen als Zwischen-
oder Nebenprodukte der Aminoacylierung von Transfer-Ribo-
nucleinsäuren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christoph Niebler

aus

München

1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. R. Thiebe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.G. Zachau

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 1980



INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung und Vorbemerkungen

1.1. Zusammenfassung und Zielsetzung 4

1.2. Begriffsabgrenzung 4

1.3. Methodik 5

1.4.1. Literatur 5

1.4.2. Geräte 16

1.4.3. Versuchsaufbau 20

1.4.4. Analysemethoden 21

2. Material und Versuch 22

Meinen Eltern

2.1. Versuchsaufbau und -durchführung 22

2.2. Beschreibung der Versuchsaufbauten 23

2.2.1. Versuchsaufbau zur Analyse von Aminosäuren 23

2.2.2. Versuchsaufbau zur Analyse von Aminosäuren 23

2.2.3. Versuchsaufbau zur Analyse von Aminosäuren 23

2.2.4. Versuchsaufbau zur Analyse von Aminosäuren 23

2.2.5. Versuchsaufbau zur Analyse von Aminosäuren 23

3. Ergebnisse 28

3.1. Versuchsaufbau 28

3.2. Versuchsaufbau 28

3.3. Versuchsaufbau 28

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Versuche und Ergebnisse	4
2.1.	Versuchsdurchführung	4
2.2.	Ergebnisse	7
2.2.1.	Isoleucin	7
2.2.2.	Serin	16
2.2.3.	Threonin	20
2.2.4.	Andere Aminosäuren	21
3.	Material und Methoden	22
3.1.	Verwendete Materialien	22
3.2.	Beschreibung der Versuche	23
3.2.1.	Anreicherung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus E. coli	23
3.2.2.	Bestimmung der Aktivität der Aminoacyl- tRNA-Synthetasen	23
3.2.3.	Inkubationen	24
3.2.4.	Trennmethoden	25
3.2.5.	Hydroxamatbildung mit isolierten Amino- acyl-Verbindungen	26
4.	Diskussion	28
5.	Zusammenfassung	32
6.	Literaturverzeichnis	33
7.	Verzeichnis der Abkürzungen	35

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Der Mechanismus der Proteinbiosynthese kann im ganzen als weitgehend geklärt angesehen werden. Dennoch gibt es einige Teilschritte, deren Ablauf noch ungelöste Probleme stellt. Ein solches Problem ist z.B. die Aktivierung der Aminosäuren.

Die Knüpfung der Peptidbindung erfordert Energie. Diese wird von der Esterbindung zwischen Aminosäure und Transfer-Ribonucleinsäure (tRNA) bereitgestellt. Die Aminoacyl-ester der verschiedenen tRNAs werden von den streng spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen unter Verbrauch von ATP gebildet. Es wird allgemein angenommen, daß es sich dabei um eine zweistufige Reaktion handelt, bei der Aminoacyl-Adenylat als Zwischenprodukt fungiert und Pyrophosphat entsteht (5,1). Dieser Mechanismus ist trotz der diesbezüglich verbreiteten Lehrmeinung als alleiniger Weg umstritten.

Für das Aminoacyl-Adenylat als Zwischenprodukt sprechen folgende Befunde:

In Abwesenheit von tRNA findet ein Austausch zwischen Pyrophosphat und ATP statt, der durch die entsprechende Aminosäure stimuliert wird (5,1,16).

Das Enzym-gebundene Aminoacyl-Adenylat kann isoliert werden und reagiert mit der zugehörigen tRNA unter Bildung der Aminoacyl-tRNA und Adenylat, mit Pyrophosphat zu ATP und Aminosäure (11).

Gegen Aminoacyl-Adenylat als obligates Zwischenprodukt können folgende Argumente angeführt werden:

Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen für Arginin (13,15,14,12,6), Glutaminsäure und Glutamin (2,9) aus verschiedenen Organismen katalysieren den Pyrophosphat/ATP-Austausch nur in Anwesenheit der zugehörigen tRNA. Die Bildung eines entsprechenden Aminoacyl-Adenylats konnte in diesen Fällen nie

nachgewiesen werden (18). Außerdem wurde z.B. gezeigt, daß die Arginyl-tRNA-Synthetase die zu erwartende Rückreaktion von Arginyl-tRNA mit AMP zum Arginyl-Adenylat nicht katalysiert (6). Letzterer Befund zeigt, daß die Abwesenheit von tRNA als essentiellern Aktivator der Aminoacyl-tRNA-Synthetase für das Ausbleiben des Pyrophosphat/ATP-Austauschs nicht verantwortlich gemacht werden kann.

Man muß also zumindest für Arginin, Glutaminsäure und Glutamin einen anderen Aktivierungsmechanismus annehmen.

Im Falle von Isoleucin (10) und Phenylalanin (23) wurde nachgewiesen, daß die Aminoacylierung der tRNA, ausgehend von ATP und der freien Aminosäure, wesentlich schneller abläuft als die Übertragung der Aminosäure vom isolierten Aminoacyl-Adenylat-Enzym-Komplex auf die tRNA.

Diese und andere Argumente sowie die Tatsache, daß unter physiologischen Bedingungen die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit tRNA gesättigt sind, waren für R.B. Loftfield die Grundlage, einen einstufigen Mechanismus für die Aminoacylierung der tRNA zu formulieren (11). Die Gegenwart der tRNA spielt in diesem Mechanismus eine entscheidende Rolle. Die Bildung des Aminoacyl-Adenylats in Abwesenheit von tRNA wäre demnach als Artefakt zu betrachten. Der einstufige Mechanismus nach Loftfield wurde bisher nicht bewiesen.

Die oben angeführten Befunde lassen sich ebenso durch mehrstufige Mechanismen erklären. Für die danach notwendigen aktiven Aminoacyl-Verbindungen als Zwischenstufe gibt es experimentelle Hinweise.

Im Falle der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe wurde ein tRNA induzierter AMP/ATP-Austausch nachgewiesen, ohne daß Aminoacylierung der tRNA stattgefunden hätte (20).

Daraus wurde auf ein Aminoacyl-Enzym als Zwischenprodukt geschlossen, das aber nicht direkt nachgewiesen werden konnte.

Am gleichen Objekt wurde auch gezeigt, daß zusätzlich zum Phenylalanyl-Adenylat noch ein weiteres aktives Phenylalanin an das Enzym gebunden werden kann (22). Die Identifizierung dieses aktiven Phenylalanins steht noch aus.

Einen ähnlichen indirekten Hinweis gibt es auch im Falle von Valin im *E. coli*-System (17).

Der direkte Nachweis einer aktiven Aminoacyl-Enzym-Verbindung gelang mit der Tryptophanyl-tRNA-Synthetase aus Rinderpankreas (7). Das Tryptophan ist in diesem Falle als Anhydrid mit der Synthetase verknüpft.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, weitere aktive Aminoacyl-Verbindungen, die bei der Aminoacylierung von tRNA eine Rolle spielen könnten, nachzuweisen und soweit möglich etwas näher zu charakterisieren.

2. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

2.1. Versuchsdurchführung

Als Ausgangsorganismus für die Anreicherung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurde *E. coli* ausgewählt, da hier, verglichen mit Eukaryonten, weniger Begleitsubstanzen abgetrennt werden mußten. Daneben besitzen die *Coli*-Enzyme eine relativ hohe Stabilität, die für die Durchführung der Präparation und auch der Versuche von großem Wert war.

Nach dem Aufschluß der Bakterien (genaue Angaben über die Methodik siehe Abschnitt 3.2.) und Streptomycinsulfat-Fällung der Nucleinsäuren wurden die Proteine durch Ammoniumsulfat-Fällung vorfraktioniert und anschließend auf einer DEAE-Cellulose-Säule mit steigendem KCl-Gradienten weiter aufgetrennt. Wie in Abb. 1 angegeben, wurde das Eluat

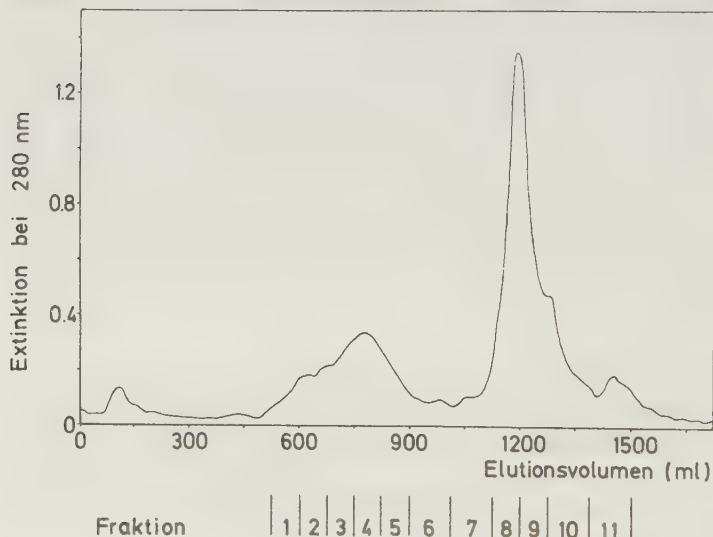


Abb. 1 Auftrennung der Proteine auf DEAE-Cellulose
mit steigendem KCl-Gradienten

Die Extinktion wurde bei 280 nm und 1 cm Schichtdicke gemessen.
Das Eluat wurde anschließend in 11 Fraktionen zusammengefaßt.

in 11 Fraktionen zusammengefaßt, die dann mittels Druckdialyse konzentriert und entsalzt sowie auf die Aktivität der in ihnen enthaltenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen getestet wurden (Tab. 1 und 2) (4,21).

Tabelle 1 Proteingehalt der einzelnen Enzym-Fraktionen

Enzymfraktion	1	2	3	4	5	6
A ₂₈₀ Einheiten/ml (= Proteingehalt (mg/ml)	3,9	23,4	25,3	21,0	19,0	13,8

Tabelle 2 Aktivitäten der angereicherten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

-tRNA-Synthetase	Enzym-Fraktion	Aktivität (mU/ml)	spezifische Aktivität (mU/mg)
Alanyl-	2	35	1,5
Arginyl-	3/ <u>4</u>	368/330	14,5/15,7
Asparaginyll-	3/4	110/97	4,3/4,6
Aspartyl-	1/ <u>2</u>	120/358	30,8/15,3
Cysteyl-	3/4	31/32	1,2/1,5
Glutaminyl-	2	56/	2,4
Glutamyl-	3/4/5	29/23/76	2,5/1,1/4,0
Glycyl-	<u>3</u> /4	107/86	4,2/4,1
Histidyl-	3/ <u>4</u>	222/210	8,8/10,0
Isoleucyl-	2	244	10,4
Leucyl-	3/4/5/ <u>6</u>	462/421/471/188	18,3/20,1/24,8/13,6
Lysyl-	3/ <u>4</u> /5	574/480/116	22,7/22,8/6,1
Methionyl-	<u>2</u>	230	9,8
Phenylalanyl-	2	209	8,9
Prolyl-	3/4	34/27	1,3/1,3
Seryl-	3/4/5	381/387/161	15,1/18,4/8,5
Threonyl-	<u>3</u> /4	161/107	6,4/5,1
Tryptophanyl-	2	35	1,5
Tyrosyl-	<u>2</u> /3	186/106	8,0/4,2
Valyl-	3/ <u>4</u>	353/350	13,9/16,7

Verwendet wurden jeweils die unterstrichenen Fraktionen

In noch nicht veröffentlichten Versuchen wiesen Thiebe et al. mit der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe die Existenz einer Adenylat-freien aktiven Phe-Verbindung nach. Dieses Zwischenprodukt ließ sich dabei nach Stoppen der Reaktion durch Denaturierung des Proteins mit Natriumdodecylsulfat (SDS) mit verschiedenen Trennmethoden als nicht Enzym-gebundene Verbindung isolieren. Dieses Resultat wurde auch mit reiner Phe-tRNA-Synthetase aus E. coli bestätigt.

Wegen der äußerst geringen Werte für die Aktivität der Ala-, AsN-, Cys-, Gln-, Glu-, Pro- und Trp-tRNA-Synthetase in der vorliegenden Präparation (siehe Tab. 2), wurden außer dem Phe auch diese Aminosäuren bei den Experimenten nicht berücksichtigt.

Die möglicherweise entstandene Aminoacyl-Verbindung wurde durch Einsatz der [^{14}C]-Aminosäure markiert. Zur Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in die gewünschte Richtung wurden die Versuche mit folgenden Zusatzreaktionen gekoppelt:

Das Pyrophosphat wurde mit Pyrophosphatase hydrolysiert, das AMP mit Hilfe von Myokinase, Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase zu ATP regeneriert und damit ebenfalls aus dem Gleichgewicht entfernt.

Da es zu erwarten war, daß die gesuchten Aminoacyl-Verbindungen ähnliche Eigenschaften besitzen wie die analoge Phe-Verbindung, wurde auch auf die bei Phe erfolgreichen Trennmethoden zurückgegriffen:

- a) Ionenaustauscher-Chromatographie mit Phosphocellulose P11
Die Carboxyl-blockierte Verbindung liegt unterhalb von pH 7 als Kation vor und läßt sich daher mit einem Kationenaustauscher recht gut isolieren.

Für die Trennung nach der Molekülgröße bzw. nach der Größe der in Gegenwart von SDS gebildeten Micellen kamen zwei

weitere Methoden zur Anwendung:

b) Elektrophorese im SDS/Polyacrylamid-Gel

c) Molekularsieb-Chromatographie mit Sephadex G-25

Damit hierbei das SDS auch bei 4°C in der notwendigen Konzentration in Lösung gehalten werden konnte, wurde dem Elutionspuffer noch Triton X-100 zugesetzt.

Zur Kontrolle wurde jeder Versuch zum einen (1) ohne ATP sowie zum anderen (2) mit der nicht markierten Aminosäure und [¹⁴C]-ATP wiederholt, damit Artefakte durch Verunreinigungen etc. sowie eine Verwechslung mit sicherlich ebenfalls entstandenem Aminoacyl-Adenylat ausgeschlossen werden konnten.

2.2. Ergebnisse

Für die verschiedenen Aminosäuren ergaben sich im einzelnen die folgenden Resultate:

2.2.1 Isoleucin

2.2.1.1. Ionenaustauscher-Chromatographie

Wie Abb. 2a-c zeigt, läßt sich nach ca. 12 min Inkubation eine Ile-Verbindung Y_{Ile} (P11)¹⁾ isolieren, die nur in Gegenwart von ATP entsteht und die auch kein Adenosin enthält, wie die Kontrollen (1) und (2) zeigen.

1) Zur Vereinfachung der Bezeichnungsweise werden die jeweiligen Aminoacylverbindungen im folgenden mit "X_{Ile} (P11)", "Y_{Ser} (G-25)" usw. abgekürzt, wobei

X	die kurze (ca. 1 min)
Y	die lange (ca. 12 min) Inkubationszeit, nach der die jeweilige Verbindung bevorzugt zu isolieren ist,
der Index	die jeweilige Aminosäure (Ile, Ser, Thr),
die Klammer	die Trennmethode (Phosphocellulose P11-Säule, Sephadex-G-25-Säule, SDS/Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

bezeichnet.

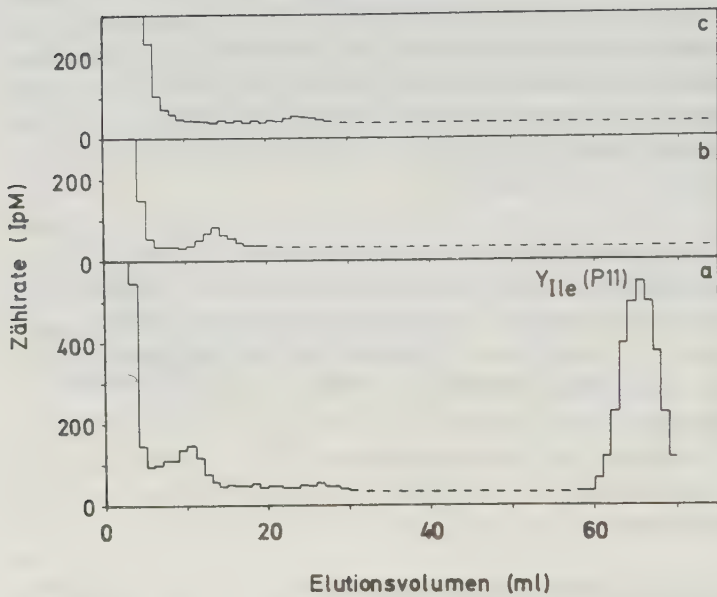


Abb. 2 Isolierung einer Ile-Verbindung ($Y_{Ile}(P11)$) mit
Phosphocellulose P11 nach 12 min Inkubation

- a) Nachweis von $Y_{Ile}(P11)$ mit [^{14}C]-Ile bei 60-70 ml
- b) Kontrolle (1): Wiederholung von (a) in Abwesenheit von ATP
- c) Kontrolle (2): Wiederholung von (a) mit [^{14}C]-ATP und [^{12}C]-Ile

Stoppt man die Reaktion bereits nach einer Minute, so stellt sich heraus, daß primär noch ein anderes Zwischenprodukt entsteht (Abb. 3). Diese Verbindung $X_{Ile}(P11)$ ist

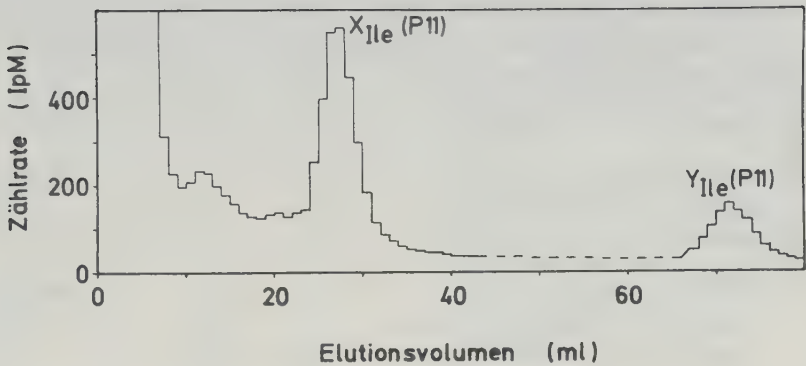


Abb. 3 Isolierung einer Ile-Verbindung ($X_{Ile}(P11)$) mit Phosphocellulose P11 nach 1 min Inkubation

Nachweis von $X_{Ile}(P11)$ bei 25-30 ml

Die Kontrollen (1) und (2) waren negativ (wie Abb. 2).

unter Versuchsbedingungen offenbar sehr reaktionsfähig, da sie nur nach relativ kurzer Inkubationszeit zu isolieren ist. Das Ile ist also durch eine recht energie-reiche Bindung mit seinem Reaktionspartner verknüpft. So ist $X_{Ile}(P11)$ nach Zugabe von tRNA nicht mehr nachzuweisen (Abb. 4), was man darauf zurückführen könnte, daß das Ile infolge des hohen Gruppenübertragungspotentials von $X_{Ile}(P11)$ sofort auf die tRNA übertragen wird. Wie auch noch weitere Versuche mit mittleren Inkubationszeiten bestätigten, verschwindet $X_{Ile}(P11)$ mit zunehmender Reaktionszeit zugunsten von $Y_{Ile}(P11)$. Diese Verbindung ist auch nach Zugabe von tRNA noch zu isolieren, d.h. das

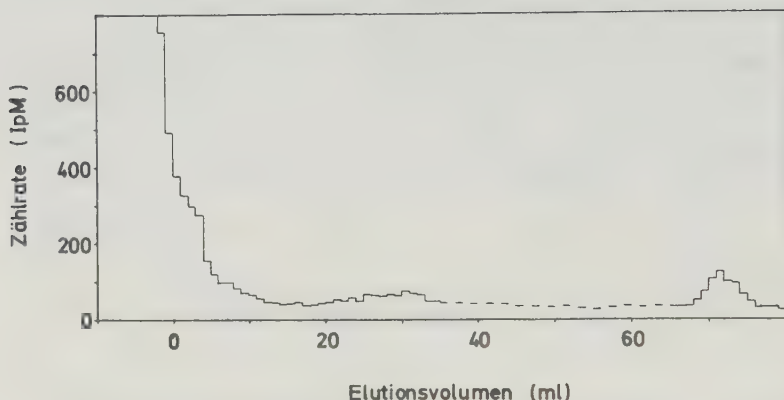


Abb. 4 Reaktion von X_{Ile} (P11) mit tRNA

Nach 1 min Inkubation wie in Abb. 3 wurden 10 μ l tRNA aus *E. coli* (400 A_{260} -Einheiten/ml) zugegeben, nach weiteren 10 sec wie in den übrigen Versuchen durch Zugabe von 80 μ l SDS (1%) gestoppt und das Gemisch an Phosphocellulose aufgetrennt:

X_{Ile} (P11) ist nicht mehr nachweisbar.

Ile kann von Y_{Ile} (P11) anscheinend nicht mehr oder nur sehr langsam auf die tRNA übertragen werden. Isoliertes Y_{Ile} (P11) reagiert aber mit Hydroxylamin immerhin noch zum Ile-Hydroxamat (Abb. 5), d.h. auch in Y_{Ile} (P11) ist das Ile noch verhältnismäßig energiereich gebunden.

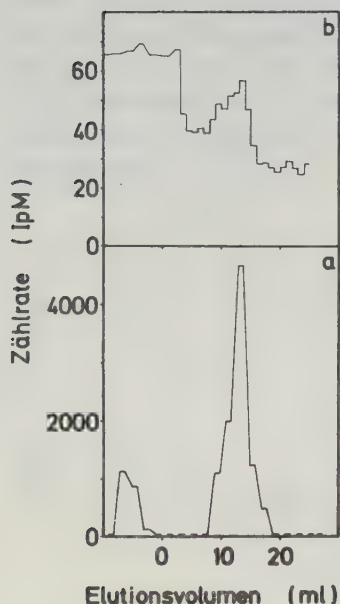


Abb. 5 Bildung von Ile-Hydroxamat aus $Y_{Ile}(P11)$

- a) Chromatographisches Verhalten von Ile-Hydroxamat auf Phosphocellulose P11 bei pH 5,0
- b) Nachweis des gebildeten Ile-Hydroxamat: $Y_{Ile}(P11)$ wurde wie in Abb. 3 isoliert, mit NH_4OH behandelt und anschließend bei pH 5 auf Phosphocellulose P11 rechromatographiert. Die Bande bei 8-15 ml kennzeichnet das Ile-Hydroxamat (wie in (a))

Führt man die Trennung durch, ohne vorher die Reaktion mit SDS zu stoppen, erhält man die $X_{Ile}(P11)$ bzw. $Y_{Ile}(P11)$ charakterisierenden Banden nicht. Außerdem ist im entsprechenden Teil des Eluats keine nennenswerte Enzymaktivität zu finden. Daraus kann man schließen, daß $X_{Ile}(P11)$ und $Y_{Ile}(P11)$ sehr fest an das Enzym gebunden sind und daher nicht vom freien Ile getrennt werden können.

2.2.1.2. Molekularsieb-Chromatographie

Auch mit dieser Methode läßt sich nach 1 min Reaktionszeit ein Ile-haltiges Zwischenprodukt ($X_{Ile}(G-25)$), das nur in Anwesenheit von ATP entsteht, vom freien Ile abtrennen (Abb. 6). Inkubiert man länger (15 min), so läßt sich nur eine Vergrößerung der Bande bei 8,5 ml Elution feststellen, man kann also in diesem Falle Kurzzeit- und Langzeit-Produkt

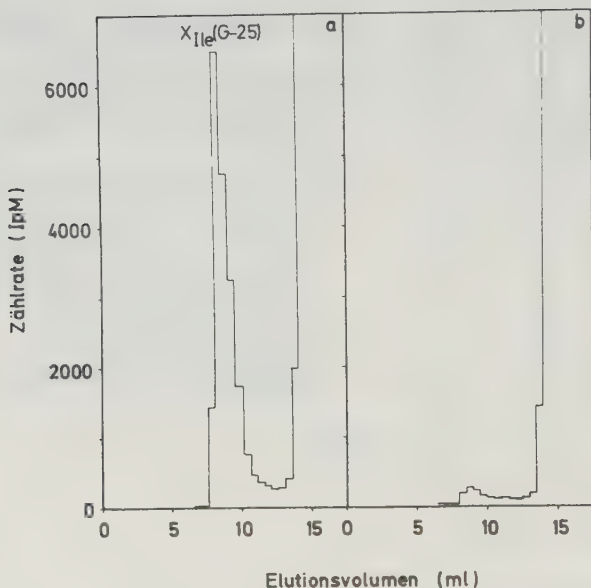


Abb. 6 Isolierung einer Ile-Verbindung (X_{Ile}(G-25)) mit
Sephadex G-25 nach 1 min Inkubation

- a) Nachweis von X_{Ile}(G-25) mit [¹⁴C]-Ile bei 8-10 ml
b) Kontrolle (1): Wiederholung von (a) in Abwesenheit von ATP

nicht unterscheiden. Vergleicht man das Ergebnis mit den Resultaten auf der Phosphocellulose-Säule, so ergibt sich eine erhebliche Diskrepanz zwischen den beiden Methoden. Mit dem Ionenaustauscher erhält man insgesamt ca. 5,3 pmol, auf der Sephadex-Säule jedoch ca. 38-50 pmol gebundenes Ile. Eine mögliche Erklärung gibt hier Kontrolle (2) mit radioaktivem ATP (Abb. 7a): Der Gipfel bei etwa 8 ml Elution enthält auch ca. 64 pmol Adenosin. Wie Abb. 7b zeigt, ist

aber auch in Abwesenheit von Ile in dieser Fraktion ein deutlicher, wenn auch kleinerer Anstieg der Radioaktivität (25 pmol Adenosin) festzustellen. Die Bande könnte also zumindest unter anderem auch Ile-AMP enthalten. Die sich hieraus ergebenden Konsequenzen werden in Abschnitt 4 abgehandelt.

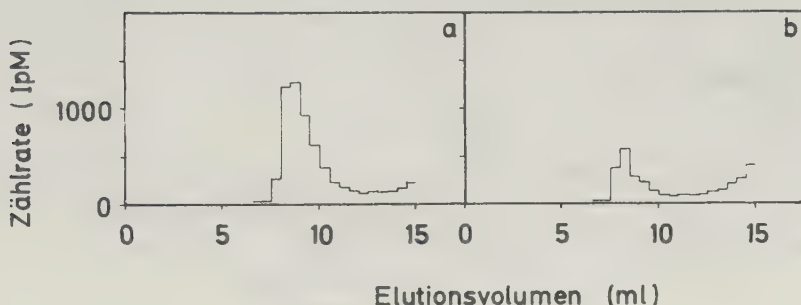


Abb. 7 Kontrolle (2) zu Abb. 6 mit [^{14}C]-ATP und [^{12}C]-Ile auf Sephadex G-25 nach 1 min Inkubation

a) in Gegenwart von [^{12}C]-Ile

b) Wiederholung von (a) in Abwesenheit von Ile

2.2.1.3. Gel-Elektrophorese

Auch hierbei lassen sich nach kurzer und langer Inkubationszeit unterschiedliche Ile-haltige Zwischenprodukte abtrennen (Abb. 8). Die Kontrollen (1) (ohne ATP) und (2) mit radioaktivem ATP ergaben, daß es sich dabei nicht um eine Verunreinigung der [^{14}C]-Aminosäure oder um Ile-AMP handeln kann.

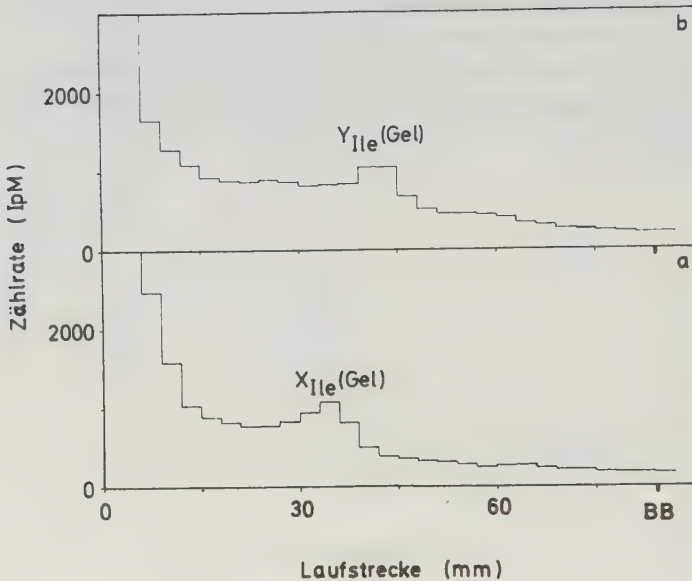


Abb. 8 Elektrophoretische Isolierung von Ile-Verbindungen im SDS/Polyacrylamidgel nach verschiedenen Inkubationszeiten

- a) Nachweis von $X_{Ile}(Gel)$ mit [^{14}C]-Ile nach 1 min Inkubation
b) Nachweis von $Y_{Ile}(Gel)$ mit [^{14}C]-Ile nach 12 min Inkubation

Die nicht abgebildeten Kontrollen (1) und (2) verliefen negativ. BB = Bromphenolblau

Abb. 9 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der in Fraktion 2 der Enzymanreicherung enthaltenen Proteine. Durch Vergleich mit den Laufstrecken bestimmter Referenz-Enzyme (Creatinkinase (40.500 g/mol); α -Glucosidase (68.000 g/mol); Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (104.000 g/mol)) konnte die Laufstrecke der Ile-tRNA-Synthetase (102.000 g/mol (3)) bei etwa 5 cm bestimmt werden. Im Verhältnis zur jeweiligen elektrophoretischen Wanderung des Bromphenolblau errechnet sich für die Ile-tRNA-Synthetase

in Abb. 8 eine Strecke von etwa 30 mm, die ungefähr der von X_{Ile} (Gel) entspricht, sich aber deutlich von der des Y_{Ile} (Gel) unterscheidet. Eine kovalente Bindung zwischen Ile und Protein wäre also für X_{Ile} (Gel) nicht auszuschließen.

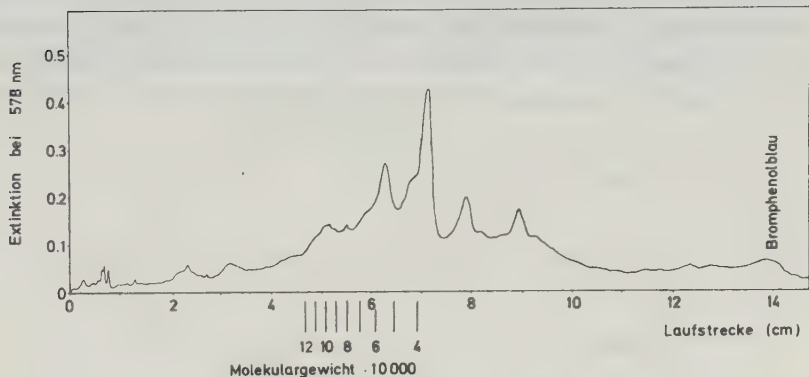


Abb. 9 Elektrophoretische Auftrennung der in Enzym-Fraktion 2 enthaltenen Proteine im SDS/Polyacrylamidgel

Die Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassie-Brillant-Blue G-250 sichtbar gemacht. Durch Vergleich mit den Laufstrecken verschiedener Referenzenzyme von bekanntem Molekulargewicht konnte das Diagramm auf Molekulargewichte geeicht werden.

Bestimmt man die Aktivität des Enzyms wie in (3), und berücksichtigt man die Wechselzahl von etwa 100 min^{-1} (3), so errechnet sich für die Fraktion 2 der Enzym-Anreicherung eine Konzentration von $1,6 \text{ nmol/ml}$, d.h. die jeweils eingesetzten $40 \text{ }\mu\text{l}$ enthalten 64 pmol Ile-tRNA-Synthetase. Dem stehen 5 pmol Ile in den isolierten Verbindungen auf der Phosphocellulose - bzw. $38\text{--}50 \text{ pmol}$ auf der Sephadex-Säule gegenüber. Das würde bedeuten, daß mindestens 8 bzw. $60\text{--}80\%$ der Enzym-Moleküle ein aktives Ile enthalten.

2.2.2. Serin

2.2.2.1. Ionenaustauscher-Chromatographie

Wie beim Ile erhält man je nach Inkubationszeit unterschiedliche Zwischenprodukte (Abb. 10). Auch hier verschiebt sich die Relation von $X_{\text{Ser}}(\text{P11})$ zu $Y_{\text{Ser}}(\text{P11})$ mit zunehmender Reaktionszeit zugunsten von $Y_{\text{Ser}}(\text{P11})$.

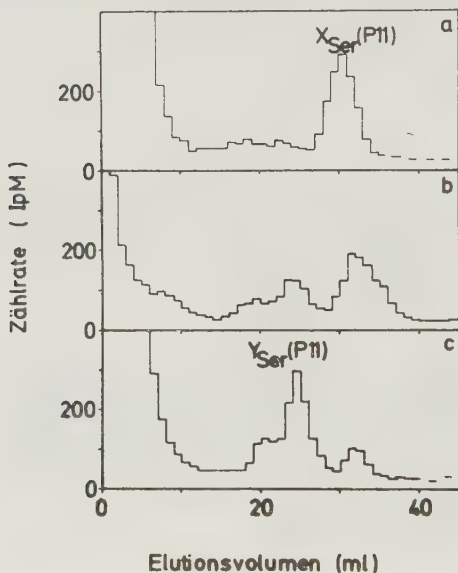


Abb. 10 Isolierung von Ser-Verbindungen mit Phosphocellulose P11 nach 1, 5 und 12 min Inkubation

- a) Nachweis von $X_{\text{Ser}}(\text{P11})$ mit [^{14}C]-Ser nach 1 min Inkubation
- b) Nachweis von $X_{\text{Ser}}(\text{P11})$ und $Y_{\text{Ser}}(\text{P11})$ nebeneinander mit [^{14}C]-Ser nach 5 min Inkubation
- c) Nachweis von $Y_{\text{Ser}}(\text{P11})$ mit [^{14}C]-Ser nach 12 min Inkubation

Nach Zusatz von tRNA ist hier kein so deutlicher Effekt wie beim Ile zu sehen.

Bemerkenswert ist aber vor allem der große Radioaktivitätsanstieg in den Kontrollen (2) mit [^{14}C]-ATP (Abb. 11). Dabei fällt nicht nur die mengenmäßige Diskrepanz, sondern auch das unterschiedliche Elutionsvolumen bezüglich der Seryl-Verbindungen auf. Diese beiden Tatsachen sprechen sicherlich gegen Ser-AMP. Hier müssen wohl zumindest zusätzlich noch andere Adenosin-Verbindungen vorliegen.

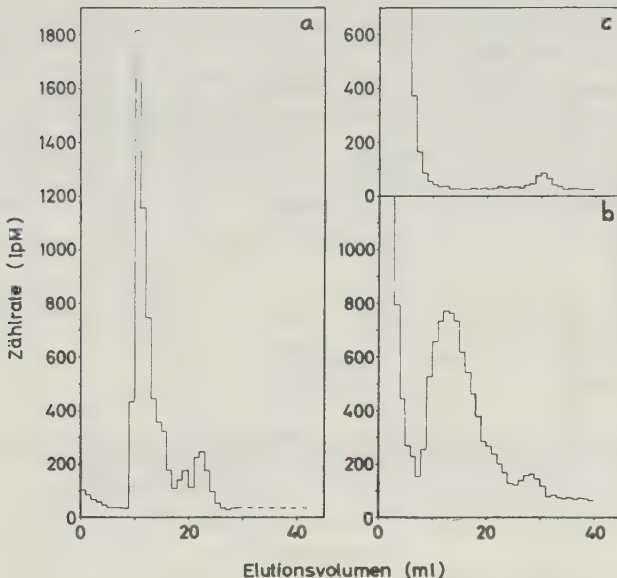


Abb. 11 Kontrollen (1) und (2) zu Abb. 10
an Phosphocellulose P11 nach ver-
schiedenen Inkubationszeiten

- a) Kontrolle (2) mit [^{14}C]-ATP und [^{12}C]-Ser nach 1 min Inkubation
- b) Kontrolle (2) mit [^{14}C]-ATP und [^{12}C]-Ser nach 12 min Inkubation
- c) Kontrolle (1) mit [^{14}C]-Ser in Abwesenheit von ATP nach 12 min Inkubation

Die entsprechende Kontrolle (1) nach 1 min Inkubation verlief ähnlich.

2.2.2.2. Molekularsieb-Chromatographie

Auch hierbei ergibt sich ein Bild, das dem des Ile zum Teil ähnelt (Abb. 12). Im Gegensatz zum Ile aber läßt sich beim Ser auch mit dieser Methode feststellen, daß je nach Reaktionszeit unterschiedliche Produkte entstehen. Die Kontrollen mit [^{14}C]-ATP werfen die gleiche Problematik wie beim Ile auf. Allerdings läßt sich hier zumindest ausschließen, daß es sich bei $\text{Y}_{\text{Ser}}(\text{G-25})$, das offenbar auch vom Enzym gelöst sein muß, um Ser-AMP handelt.

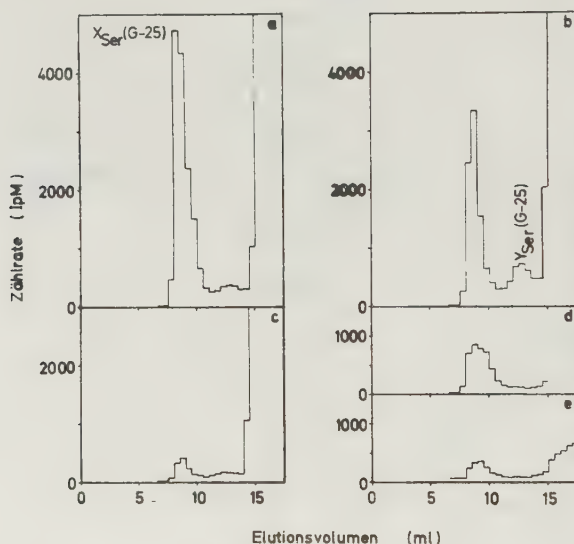


Abb. 12 Isolierung von Ser-Verbindungen mit Sephadex G-25 nach verschiedenen Inkubationszeiten

- Nachweis von $\text{X}_{\text{Ser}}(\text{G-25})$ mit [^{14}C]-Ser nach 1 min Inkubation
- Nachweis von $\text{Y}_{\text{Ser}}(\text{G-25})$ mit [^{14}C]-Ser nach 12 min Inkubation
- Kontrolle (1): Wiederholung von (a) in Abwesenheit von ATP
- Kontrolle (2): Wiederholung von (a) mit [^{14}C]-ATP und [^{12}C]-Ser
- Wiederholung von (d) in Abwesenheit von Ser

2.2.2.3. Gel-Elektrophorese

Die Ergebnisse der beiden chromatographischen Methoden lassen sich zum Teil auch mittels Elektrophorese bestätigen (Abb. 13). Die Bande, die das aktivierte Ser enthält, lässt sich auch nach Proteinase-Behandlung noch nachweisen, d.h. das Ser ist offenbar nicht direkt an das Enzym gebunden.

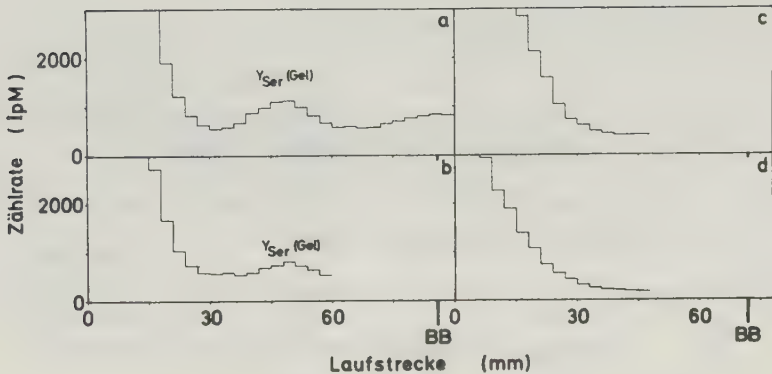


Abb. 13 Elektrophoretische Isolierung einer Ser-Verbindung ($Y_{Ser}(Gel)$) nach 12 min Inkubation

- a) Nachweis von $Y_{Ser}(Gel)$ mit [^{14}C]-Ser nach 12 min Inkubation
 - b) Nachweis von $Y_{Ser}(Gel)$ mit [^{14}C]-Ser nach 12 min Inkubation und anschließender Proteinase-Verdauung (10 min Nachinkubation mit 1 mg/ml Proteinase K bei Raumtemperatur)
 - c) Kontrolle (1): Wiederholung von (a) in Abwesenheit von ATP
 - d) Kontrolle (2): Wiederholung von (a) mit [^{14}C]-ATP und [^{12}C]-Ser
- BB = Bromphenolblau

2.2.3. Threonin

Wie die Elutionsprofile mit Sephadex G-25 und Phosphocellulose P11 zeigen, lassen sich auch beim Thr 1 bzw. 2 unterschiedliche Verbindungen nachweisen (Abb. 14 und 15).

Die Kontrolle (2) mit [^{14}C]-ATP ergibt auf dem Ionenaustauscher ähnliche Verhältnisse wie beim Ser, wenn sich auch die ATP-Radioaktivität hier nicht von der des X_{Thr} (P11) trennen läßt. Immerhin sprechen dabei aber der Mengenunterschied sowie das Auftreten von zwei Gipfeln dagegen, daß es sich dabei (ausschließlich) um Thr-AMP handelt.

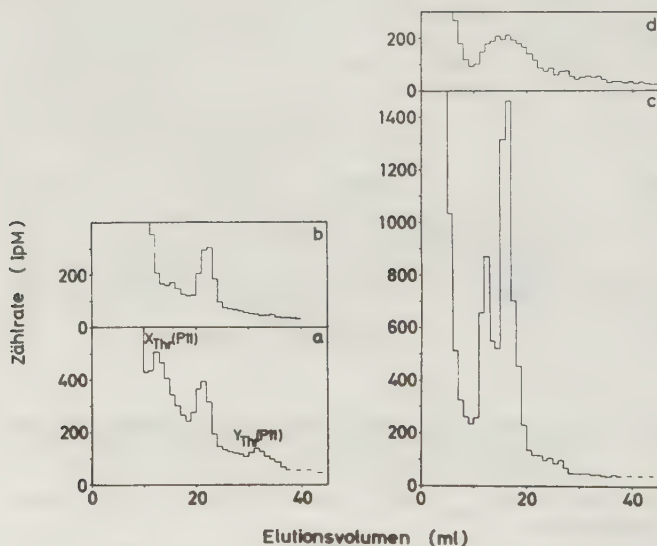


Abb. 14 Isolierung von Thr-Verbindungen mit Phosphocellulose P11 nach 1 min Inkubation

- a) Nachweis von X_{Thr} (P11) und Y_{Thr} (P11) mit [^{14}C]-Thr bei 12 bzw. 32 ml
- b) Kontrolle (1): Wiederholung von (a) in Abwesenheit von ATP
- c) Kontrolle (2): Wiederholung von (a) mit [^{14}C]-ATP und [^{12}C]-Thr
- d) Wiederholung von (c) in Abwesenheit von Thr

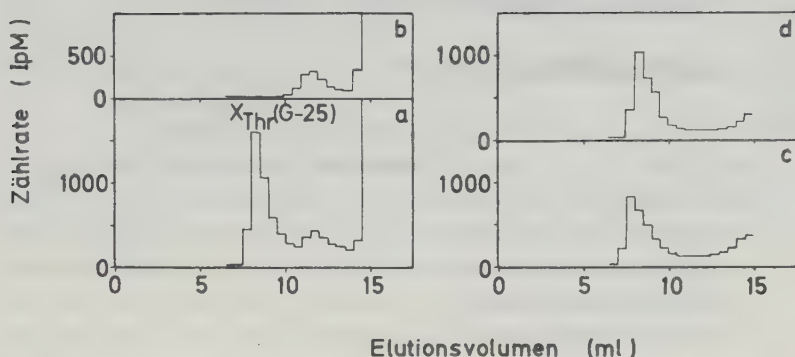


Abb. 15 Isolierung einer Thr-Verbindung ($X_{\text{Thr}}(\text{G-25})$) mit Sephadex G-25 nach 1 min Inkubation

- a) Nachweis von $X_{\text{Thr}}(\text{G-25})$ mit [^{14}C]-Thr bei 8 ml
- b) Kontrolle (1): Wiederholung von (a) in Abwesenheit von ATP
- c) Kontrolle (2): Wiederholung von (a) mit [^{14}C]-ATP und [^{12}C]-Thr
- d) Wiederholung von (c) in Abwesenheit von Thr

Das Bild, das sich auf der Sephadex-Säule ergibt, gleicht dem des Ile und des Ser.

Die auch mit Thr durchgeführte Gel-Elektrophorese lieferte leider nur negative Ergebnisse.

2.2.4. Andere Aminosäuren

Beim Phe ist die Existenz einer analogen Verbindung bereits bekannt

Ebenso wie Ile, Ser und Thr wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch Arg, Asp, Gly, His, Leu, Lys, Met, Tyr und Val untersucht. Im Zusammenhang mit den dabei ebenfalls durchgeführten Kontrollen (1) in Abwesenheit von ATP ergab sich aber mit den angewandten drei verschiedenen Trennmethode kein Anhaltspunkt für die Existenz einer entsprechenden Aminoacyl-Verbindung.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Verwendete Materialien

[¹⁴C]-markierte Verbindungen (Radiochemical Centre,
Amersham, England)

ATP: 55 Ci/mol

L-Ile: 342 Ci/mol

L-Ser: 172 Ci/mol

L-Thr: 226 Ci/mol

und verschiedene andere Aminosäuren

Escherichia coli R245 (E. Merck, Darmstadt)

tRNA aus E. coli (Boehringer, Mannheim)

Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel

Myokinase aus Schweinemuskel (Boehringer, Mannheim)

anorganische Pyrophosphatase aus Hefe

Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden)
Dextranblau 2000

DEAE-Cellulose DE52

Phosphocellulose P11 (Whatman Ltd. Springfield Mill
Glasfiber-Filter GF/C Maidstone Kent, England)

Membran für Ultrafiltration PM30 (Amicon Corp. Lexington,
Mass. 02173 USA)

Triton X-100

DTT (Serva Feinbiochemica,
Heidelberg)

Coomassie-Brillant-Blue G-250

Bromphenolblau

Glutathion (E. Merck, Darmstadt)

ATP

3.2. Beschreibung der Versuche

3.2.1. Anreicherung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus E. coli

Nach Aufschluß von 50 g tiefgefrorenen E. coli R245 mit 100 g Al_2O_3 und Aufnahme des Gemischs in Phosphat-Puffer (30 mM KH_2PO_4 , 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, pH 7,2) wurden nach Zugabe von etwas Desoxyribonuclease und Phenylmethan-sulfonylfluorid durch zweimalige Zentrifugation (30 min bei 20.000 g; 90 min bei 100.000 g) die groben Bestandteile abgetrennt. Anschließend wurden die Nucleinsäuren mit Streptomycinsulfat (1%) gefällt und verworfen. Die Proteine wurden durch Ammoniumsulfat-Fällung vorfraktioniert. Der zwischen 35% und 75% Sättigung fällbare Anteil wurde schließlich nach Entsalzung mit einer Sephadex G-25-Säule über eine DEAE-Cellulose-Säule durch Elution mit steigender KCl-Konzentration (je 1 l 0 bzw. 1 M KCl) weiter aufgetrennt (s.a. Abb. 1). Das Eluat wurde zu 11 Fraktionen zusammengefaßt sowie mittels Druckdialyse mit einer Amicon PM30-Membran konzentriert und entsalzt.

3.2.2. Bestimmung der Aktivität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Der Enzymtest wurde ähnlich wie in (4,21) ("Standard-Enzymtest") als Dreifachbestimmung mit 100 µl-Proben folgender Zusammensetzung durchgeführt:

25 µM [^{14}C]-L-AA; 4-5 µg der Protein-Fraktion; 75 A_{260} -Einheiten/ml unfraktionierte tRNA aus E. coli; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 6 mM KH_2PO_4 ; 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 15 mM MgCl_2 ; 0,02 mg Rinderserum-Albumin; 0,1 mM DTT; 0,12% Glutathion; 2% Glycerin.

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet, nach 5 min Inkubation bei 37°C mit einem Gemisch aus Trichlor-

essigsäure (3,3%/66,6 Vol %) gestoppt und der Niederschlag über Glasfiber-Filter abfiltriert sowie zweimal mit Tri-chloressigsäure und einmal mit Äthanol gewaschen. Die Filter wurden getrocknet und nach Zusatz von 5 ml Toluol-Szintillator im Szintillationszähler gezählt.

Die Blindwerte wurden in Abwesenheit von Enzym bestimmt und bei der Berechnung abgezogen.

3.2.3. Inkubationen

Die einzelnen Versuchsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

a) Darstellung der [^{14}C]-Aminoacylverbindung:

20-40 μM [^{14}C]-L-AA; 10-12 mg/ml der Protein-Fraktion;
1,25 mM ATP; 25 mM Tris; 10 mM MgSO_4 ; 25 mM KCl; 0,25 mM DTT; 78 μM Phosphoenolpyruvat; 0,03 mg/ml Pyruvatkinase;
0,01 mg/ml Myokinase; 0,006 mg/ml Pyrophosphatase; pH 7,0

b) Kontrolle (1):

20-40 μM [^{14}C]-L-AA; 10-12 mg/ml Protein-Fraktion;
25 mM Tris; 10 mM MgSO_4 ; 25 mM KCl; 0,25 mM DTT; pH 7,0

c) Kontrolle (2):

1,25 mM [^{12}C]-L-AA; 10-12 mg/ml Protein-Fraktion;
0,125 mM [^{14}C]-ATP; 25 mM Tris; 10 mM MgSO_4 ; 25 mM KCl;
0,25 mM DTT; 78 μM Phosphoenolpyruvat; 0,03 mg/ml Pyruvatkinase; 0,01 mg/ml Myokinase; 0,006 mg/ml Pyrophosphatase; pH 7,0

Die jeweils verwendeten Protein-Fractionen siehe Tab. 2.
Für die beiden chromatographischen Trennmethode wurden jeweils 80 μl , für die Gelelektrophorese je 40 μl angesetzt.
Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet,

zwischen 1 und 15 min bei Raumtemperatur (ca. 21°C) inkubiert und durch Zugabe von SDS (s.a. Abschnitt 3.2.3.) gestoppt.

3.2.4. Trennmethoden

3.2.4.1. Ionenaustauscher-Chromatographie mit Phosphocellulose P11

Als Säulen wurden Pasteurpipetten (ca. 16 mm² X 70 mm) verwendet. Das Inkubationsgemisch wurde zum Stoppen der Reaktion mit 80 µl SDS (1%) versetzt, mit 1,6 ml Startpuffer (s. unten) verdünnt und aufgezogen. Nach Vorwaschen mit 10-20 ml Startpuffer erfolgte die Elution mit steigendem K⁺-Gradienten (je 100 ml 10 mM bzw. 0,4 M KH₂PO₄; 1 mM EDTA; pH 6,0). Zum Schluß wurde durch Nacheluieren mit hoher Salzkonzentration (0,4 M) die Vollständigkeit der Elution aller radioaktiven Substanzen kontrolliert. Von jeder (etwa 1 ml großen) Fraktion wurden 750 µl mit 5 ml Toluol/Triton-Szintillator im Szintillationszähler gezählt.

3.2.4.2. Molekularsieb-Chromatographie mit Sephadex G-25

Die Reaktion wurde hier durch Zusatz von 15 µl SDS (20%) gestoppt. Nach Kalibrierung der Säule mit Dextranblau 2000 und Auftragen des Gemischs wurde mit folgendem Puffer eluiert:

10 mM NaCl, 2 mM Kaskodylsäure; 1% SDS; 2% Triton; pH 7,0

Die etwa 0,5 ml großen Fraktionen wurden mit je 5 ml Toluol/Triton-Szintillator im Szintillationszähler gezählt.

3.2.4.3. Elektrophorese im SDS/Polyacrylamid-Gel

Die Elektrophorese wurde mit dem Gerät Nr. 490 von E.C. Apparatus (Philadelphia Pa.) durchgeführt. Das Trenngel

setzte sich wie folgt zusammen: 25 mM Imidazol; 0,1% SDS; 7% Acrylamid; 0,6% Methylenbisacrylamid; 0,1% Tetramethyl-äthylendiamin; pH 7,0.

Die Polymerisation wurde durch Zusatz von 0,05% Ammoniumpersulfat gestartet. Zum Stoppen der Reaktion wurden 10 μ l des folgenden Gemischs benutzt: 62,5 mM Tris; 2% SDS; 10% Glycerin; 0,005% Bromphenolblau; pH 6,8.

Die Elektrophorese wurde etwa 3-4 h mit 200 V/200 mA betrieben. Zur Vermeidung von pH-Verschiebungen wurde dabei der Elektrodenpuffer (25 mM Imidazol; 0,1% SDS; pH 7,0) ständig umgewälzt und auf ca. 13°C gekühlt.

Die Auswertung des Versuchs erfolgte in der Weise, daß die einzelnen Gel-Bahnen in Scheiben à 3 mm bei 90°C 60 min mit je 0,5 ml NH_3 (2,5%) und weitere 30 min mit je 0,5 ml H_2O behandelt wurden. Die dadurch aus dem Gel freigesetzten [^{14}C]-markierten Verbindungen wurden anschließend mit je 5 ml Toluol/Triton-Szintillator im Szintillationszähler gezählt.

Die Proteinbanden wurden ähnlich wie in (8) mit Coomassie-Brillant-Blue G-250 angefärbt; anschließend wurde die Extinktion bei 578 nm bestimmt.

3.2.5. Hydroxamatbildung mit isolierten Aminoacylverbindungen

Zur Abtrennung des Hydroxamats wurde Phosphocellulose P11 verwendet (Elutionspuffer wie oben; pH 5,0).

- a) Für den erforderlichen Referenzwert wurde das Hydroxamat durch Umsetzung des enzymatisch gebildeten Aminoacyl-Adenylats dargestellt und anschließend chromatographiert:

15 μM [^{14}C]-L-AA; 0,8-1 mg/ml Protein-Fraktion; 4 mM ATP; 0,5 M NH_2OH ; 40 mM Tris; 12 mM MgCl_2 ; 0,8 mg Rinderserum-

Albumin; 0,1% Glutathion; pH 8,0.

Es wurden 50 μ l 30 min bei 37°C inkubiert.

- b) Die jeweilige [14 C] Aminoacyl-Verbindung wurde wie in (3.2.3. a) dargestellt und isoliert. 2 ml davon wurden auf ca. 100 mM NH_2OH und pH 8,0 eingestellt und 30 min bei 37°C inkubiert.
- c) Nach entsprechender Verdünnung (ca. 1:10) und pH-Korrektur wurde die Lösung schließlich bei pH 5,0 auf Phosphocellulose P11 rechromatographiert.

4. DISKUSSION

Zur Isolierung von aktiven Aminoacyl-Verbindungen bei der Aminoacylierung von tRNA wurden drei verschiedene Methoden angewandt.

Die verschiedenen Aminoacyl-Verbindungen können aber recht unterschiedliche Eigenschaften besitzen, da der Ligand, an den die Aminosäure gebunden ist, sowohl ein Makromolekül, wie z.B. die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase aus Rinderpankreas (7), als auch irgendein kleineres Molekül wie z.B. im Falle des aktivierten Phenylalanins bei Hefe (23) sein kann. Wegen dieser Variabilität ist es weiter nicht verwunderlich, daß mit den drei Trennmethoden nicht alle existierenden Verbindungen sämtlicher Aminosäuren erfaßt werden können. Auch die jeweils günstigsten Reaktionsbedingungen für die Entstehung dieser Produkte dürften von Aminosäure zu Aminosäure recht unterschiedlich sein. Wenn sich also hier wie im Falle der Arginyl-, Aspartyl-, Glycyl-, Histidyl-, Leucyl-, Lysyl-, Methionyl-, Tyrosyl- und Valyl-tRNA-Synthetase aus E. coli kein Hinweis für die Existenz einer aktiven Aminoacyl-Verbindung ergab, kann man keineswegs deshalb auf deren Nicht-Existenz schließen.

Eindeutig positive Resultate ergaben sich für das aktivierte Isoleucin. Hier ließen sich mit dem Kationenaustauscher zwei verschiedene Isoleucyl-Verbindungen isolieren, die kein Adenosin enthielten. Mit zunehmender Inkubationszeit verschob sich die Relation der beiden Produkte, wobei die Summe des gebundenen Isoleucins aber konstant blieb. Das reaktionsfähigere Produkt wandelte sich offenbar in die andere Verbindung um, besetzte aber anscheinend immer noch die Bindungsstellen des Enzyms, da ja die eigentlich zu erwartende sofortige Neubildung des "Primär"-Produkts aus den im Überschuß vorhandenen Reaktanten ausblieb. Ohne Detergens-Zusatz ließen sich diese beiden Verbindungen

nicht mehr nachweisen; auch dies spricht für eine relativ feste Verbindung mit dem Enzym.

Nach Zusatz von tRNA war nur noch das "Sekundär"-Produkt nachzuweisen. Das Isoleucin konnte offenbar nur vom reaktionsfähigeren "Primär"-Produkt auf die tRNA übertragen werden. Der gleiche Befund ließe sich natürlich auch dadurch erklären, daß die Gegenwart der tRNA den Abbau der Verbindung beschleunigt, was aber als weniger wahrscheinlich einzuschätzen ist. Ein negatives oder unklares Ergebnis dieses Versuchs, wie es bei der "sekundären" Isoleucyl-Verbindung oder bei den Serin-Produkten gefunden wurde, könnte auch daraus resultieren, daß die Übertragung der Aminosäure auf die tRNA langsamer vor sich ging als die Neubildung der jeweiligen Aminoacyl-Verbindung. Es spricht deshalb nicht unbedingt gegen die Übertragbarkeit.

Da unter physiologischen Bedingungen die tRNA ständig gegenwärtig ist, dürfte - wenn überhaupt - nur das reaktionsfähigere "Primär"-Produkt in vivo als Zwischenstufe fungieren. Es ist natürlich durchaus denkbar, daß in Wirklichkeit primär noch andere Aminoacyl-Verbindungen entstehen, die hier nicht nachgewiesen werden konnten, so daß sich das gefundene "Primär"-Produkt lediglich in einer - wahrscheinlich noch reversiblen - Folgereaktion bildet, die möglicherweise nur unter Versuchsbedingungen abläuft. Letzteres dürfte im besonderen für das "Sekundär"-Produkt gelten, das aber immerhin noch Isoleucin in energiereicher Bindung enthielt, weil es ja mit Hydroxylamin unter Bildung von Isoleucyl-Hydroxamat reagierte.

Auch mittels Gel-Elektrophorese in Natriumdodecylsulfat ließen sich je nach Inkubationszeit zwei verschiedene Adenosin-freie Isoleucyl-Verbindungen isolieren. Die Trennung von Proteinen erfolgte hier nach ihrer Größe, weil die durch Micellen-Bildung mit Dodecylsulfat erworbene negative Ladung für die Wanderungsgeschwindigkeit aus-

schlaggebend ist. Vergleicht man die Laufstrecke des "Primär"-Produkts mit der für die Isoleucyl-tRNA-Synthetase berechneten, so ergibt sich im Rahmen der Versuchsgenauigkeit, daß es - im Gegensatz zum "Sekundär"-Produkt - an das Enzym gebunden sein könnte. Die ungefähr gleich große Laufstrecke kann allerdings auch zufällig bedingt sein, da infolge von Micellenbildung mit dem Detergens auch relativ kleine Moleküle makromolekulare Eigenschaften erhalten können.

Auf der Phosphocellulose-Säule läßt sich eine Bindung des Isoleucins direkt an das Protein weder bestätigen noch ausschließen. Stoppt man nämlich die Reaktion nicht mit Dodecylsulfat, so läßt sich in dem Bereich des Eluats, wo das "Primär"-Produkt sonst erscheint, keine nennenswerte Enzymaktivität und auch keine Isoleucyl-Verbindung nachweisen. Es wäre also denkbar, daß letztere erst durch den Detergenszusatz vom Enzym gelöst wird und dann vom Ionenaustauscher gebunden werden kann. Andererseits ist anzunehmen, daß das Enzym in denaturiertem Zustand anders eluiert als im nativen. Daher schließen die Versuche mit der Phosphocellulose eine kovalente Bindung zwischen Isoleucin und Synthetase nicht aus.

Auf der Sephadex-Säule wurde die Existenz von aktiven Aminoacyl-Verbindungen grundsätzlich bestätigt. Allerdings ließen sich - außer andeutungsweise bei den Seryl-Verbindungen - die verschiedenen Aminoacyl-Produkte nicht voneinander trennen. Auch die ATP-Radioaktivität konnte nicht von der der Aminosäure getrennt werden. Dies wie auch die mengenmäßige Diskrepanz zur Phosphocellulose-Säule spricht dafür, daß sich hinter der gefundenen Bande mehrere verschiedene Verbindungen verbergen. Da aber das Verhältnis von Adenosin zu Aminosäure 1:1 ist, liegt zunächst der Verdacht nahe, es handle sich um Aminoacyl-Adenylat. Andererseits ist aber bekannt, daß freies Phenylalanyl- und auch Seryl-Adenylat bzw. deren Micellen sich auf der Sephadex-Säule nicht wie Makromoleküle verhalten. Daraus und aus der Anwesenheit von

Detergens müßte man dann folgern, daß das Aminoacyl-Adenylat kovalent an das Enzym gebunden ist. Dies dürfte aber ziemlich unwahrscheinlich sein. Der beobachtete Anstieg der ATP-Radioaktivität ist wohl eher durch irgendwelche andere adenylylierte Verbindungen in der Protein-Fraktion verursacht. Die stimulierende Wirkung von Isoleucin und Serin auf die Bildung dieser Produkte könnte man durch die Entstehung über Aminoacyl-Adenylat als Zwischenstufe erklären.

Eine derartige Stimulierung der Bildung von Adenosin-Verbindungen durch Serin bzw. Threonin wurde auch auf der Phosphocellulose-Säule beobachtet. Daß es sich hierbei um die Aminoacyl-Adenylate handeln könnte, muß dabei auch deshalb in Frage gestellt werden, weil das Verhältnis von Adenosin zu Aminosäure etwa 13:1 beträgt, also weit von der geforderten Stöchiometrie abweicht. Auch Produkte wie Diadenosin-Tetraphosphat oder Diadenosin-Triphosphat, die aus den Aminoacyl-Adenylaten entstehen können (24), kommen eigentlich nicht in Frage, da sie wegen ihrer Ladung am Kationenaustauscher nicht gebunden und wegen ihrer Größe auf der Sephadex-Säule nicht vom freien ATP getrennt werden dürften.

Ansonsten zeigten die Versuche mit der Seryl- und auch mit der Threonyl-tRNA-Synthetase grundsätzlich ähnliche Verhältnisse wie beim Isoleucin, wenn sich auch für die Reaktionsfähigkeit der Verbindungen hier nicht so klare Hinweise ergaben. Der elektrophoretische Befund mit Abbau durch Proteinase K deutet auch darauf hin, daß das Serin in der aktivierten Form nicht direkt an das Enzym gebunden ist. Die vollständige Hydrolyse des in der Anreicherung enthaltenen Proteingemischs muß jedoch angezweifelt werden.

Die klarsten Resultate ergaben sich allerdings mit der Isoleucyl-tRNA-Synthetase. Wie die Befunde von R.B. Loftfield et al. (10) zeigen, muß gerade für die Aminoacylierung der tRNA^{Ile} aus E. coli neben dem bekannten Weg über das Isoleucyl-Adenylat noch ein zweiter, schnellerer Reaktionsmechanismus existieren. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen aktiven Isoleucyl-Verbindungen könnten als weiterer möglicher Hinweis für einen alternativen Mechanismus gewertet werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für den Nachweis von aktiven Aminoacyl-Verbindungen bei der Aminoacylierung von tRNA wurden die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen von *E. coli* teilweise angereichert. Gearbeitet wurde nur mit den 12 Aminosäuren, deren Synthetasen nach der Anreicherung in brauchbarer Aktivität vorlagen. Zur Isolierung der gesuchten Aminoacyl-Verbindungen kamen Ionenaustauscher- und Molekularsieb-Chromatographie sowie Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Anwendung.

Positive Resultate ergaben sich für Isoleucin, Serin und Threonin.

Mit Isoleucin und Serin konnten jeweils zwei unterschiedliche Verbindungen nachgewiesen werden, deren Mengenverhältnis von der Reaktionszeit abhängig war. Bei längerer Inkubation verschwand das Primär-Produkt vollkommen zugunsten des Sekundär-Produkts.

Die beiden Isoleucyl-Verbindungen, die kein Adenylat enthielten, wurden noch näher charakterisiert. Für das Primär-Produkt ergab sich die Möglichkeit einer kovalenten Bindung zum Enzym. Außerdem konnte die Übertragbarkeit des Ile auf die zugehörige tRNA wahrscheinlich gemacht werden. Die Reaktionsfähigkeit des Sekundär-Produkts, das zwar die tRNA nicht mehr oder nur sehr langsam mit Ile beladen konnte, wurde durch Umsetzung mit Hydroxylamin und Nachweis des gebildeten Ile-Hydroxamats gezeigt.

Die isolierten Seryl- und Threonyl-Verbindungen enthielten wahrscheinlich ebenfalls kein Adenylat. Allerdings konnten hier zusätzlich auch erhebliche Mengen von Adenosin-Verbindungen nachgewiesen werden, deren Bildung zum Teil durch die Aminosäure stimuliert wurde. Deshalb war die Abgrenzung der Serin- und Threonin-Produkte gegen die entsprechenden Aminoacyladenylate schwieriger als die der Isoleucin-Verbindungen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Berg, P. (1956) J. Biol. Chem. 222, 1025-1034
2. Deutscher, M.P. (1967) J. Biol. Chem. 242, 1132-1139
3. Durecovic, A., Flossdorf, J. und Kula, M.-R. (1973) European J. Biochem. 36, 528-533
4. Hirsch, R. und Zachau, H.G. (1976) Z. Physiol. Chem. 357, 509-526
5. Hoagland, M.B. (1955) Biochim. Biophys. Acta 16, 288-289
6. Jakubowski, H., Pastuszyn, A. und Loftfield, R.B. (1978) Biochim. Biophys. Acta 520, 568-576
7. Kovaleva, G.K., Moroz, S.G., Favorova, O.O. und Kisselev, L.L. (1978) FEBS Letters 95, 81-84
8. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-682
9. Lee, W., Ravel, J.M. und Shive, W. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121, 614-618
10. Lövgren, J.N.E., Heinonen, J. und Loftfield, R.B. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3854-3860
11. Loftfield, R.B. (1972) Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol. 12, 87-128
12. Mehler, A.H. und Mitra, S.K. (1967) J. Biol. Chem. 242, 5495-5499

13. Mitra, S.K. und Mehler, A.H. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5161-5162
14. Mitra, S.K. und Mehler, A.H. (1967) J. Biol. Chem. 242, 5490-5494
15. Mitra, S.K. und Smith, C.J. (1969) Biochim. Biophys. Acta 190, 222-224
16. De Moss, J.A. und Novelli, G.D. (1955) Biochim. Biophys. Acta 18, 292-293
17. Mulvey, R.S. und Fersht, A.R. (1977) Biochemistry 16, 4005-4013
18. Parfait, R. und Grosjean, H. (1972) European J. Biochem. 30, 242-249
19. Ravel, J.M., Wang, S.-F., Heinemeyer, C. und Shive, W. (1965) J. Biol. Chem. 240, 432-438
20. Remy, P. und Ebel, J.P. (1976) FEBS Letters 61, 28-31
21. Rigler, R., Cronvall, E., Hirsch, R., Pachmann, U. und Zachau, H.G. (1970) FEBS Letters 11, 320-323
22. Thiebe, R. (1975) FEBS Letters 60, 342-345
23. Thiebe, R., unveröffentlicht
24. Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L., Janeway, C.M. und Randerath, K. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 91-97

7. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AA-, AA	Aminoacyl-, Aminosäure
A ₂₆₀ -Einheit	Extinktion, gemessen bei 260 nm
A ₂₈₀ -Einheit	bzw. 280 nm und 1 cm Schichtdicke
DEAE-Cellulose	Diäthylaminoäthyl-Cellulose
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
IpM	Impulse pro Minute (Zählrate)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
X _{AA} ()	
Y _{AA} ()	siehe Fußnote S. 7

Herrn Professor Dr. H.G. Zachau danke ich vielmals für die Förderung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Thiebe, vor allem auch für seine ständige Bereitschaft, mit Diskussion und Ratschlägen weiterzuhelfen. Für die Unterstützung bei der technischen Durchführung der Versuche danke ich insbesondere Frau R. Lamm und Herrn J. Seidel.

LEBENSIAUF

Am 1.6.1954 wurde ich als Sohn des damaligen Studienrats Xaver Niebler und dessen Ehefrau Dr. Edith Niebler, geborene Listl, in Ingolstadt geboren. Meine frühe Kindheit verbrachte ich in Tegernheim bei Regensburg, bis ich 1958 mit meinen Eltern nach München umzog. Dort besuchte ich von 1960 bis 1964 die Volksschule an der Simmernstraße und anschließend das Maximiliansgymnasium, wo ich 1973 das Abitur bestand. Nach einem dreimonatigem Chemie-Studium an der Universität München wechselte ich auf das Studium der Zahnheilkunde um, das ich im Sommersemester 1975 an der Universität Würzburg begann. Dort legte ich im Herbst 1975 die naturwissenschaftliche und im Frühjahr 1977 die zahnärztliche Vorprüfung ab. Die zahnärztliche Prüfung bestand ich im Dezember 1979.

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von Januar bis Juli 1980.

